

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-213890

(43)Date of publication of application : 05.08.1994

(51)Int.Cl. G01N 33/536
G01N 33/531
G01N 33/543

(21)Application number : 05-004973

(71)Applicant : KYOWA MEDEX CO LTD

(22)Date of filing : 14.01.1993

(72)Inventor : TAKENAKA HIDEKI
KONO HIROAKI

(54) IMMUNITY MEASUREMENT METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a measurement method without non-specific agglutination, especially any interval phenomenon during continuous measurement, by achieving reaction with an antigen to be measured in a sample or an antibody to be measured in a state for negatively charging the antibody for the antigen to be measured or the antigen for the antibody to be measured.

CONSTITUTION: Agglutination change of antigen-antibody in reaction is measured by performing adjustment so that the antibody for an antigen to be measured or the antigen for the antibody to be measured are charged to negative in a reaction liquid and achieving reaction of the antigen to be measured or the antibody to be measured in the sample. Cancer fetal antigen, immunoglobulin, and antibodies etc., for cause viruses of each kind of infection disease are listed as the antigen to be measured or the antibody to be measured. Antibodies which can react with normal antigens such as polyclonal antibody for the antigen to be measured and monoclonal antibody for the antigen to be measured are mentioned as antibodies for the antigen to be measured. Also, the antigen for the antibody to be measured may be at the antibody connection site of a natural antigen or may be created artificially by genic engineering.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.12.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3333569

[Date of registration] 26.07.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3333569号
(P3333569)

(45) 発行日 平成14年10月15日 (2002. 10. 15)

(24) 登録日 平成14年 7 月26日 (2002. 7. 26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

G 0 1 N 33/536

G 0 1 N 33/536

F

33/531

33/531

B

33/543

5 8 1

33/543

5 8 1 J

請求項の数17(全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平5-4973

(22) 出願日

平成 5 年 1 月14日 (1993. 1. 14)

(65) 公開番号

特開平6-213890

(43) 公開日

平成 6 年 8 月 5 日 (1994. 8. 5)

審査請求日

平成11年12月24日 (1999. 12. 24)

(73) 特許権者 000162478

協和メデックス株式会社

東京都中央区入船二丁目 1 番 1 号

(72) 発明者

竹中 英樹

静岡県駿東郡長泉町南一色512- 1

(72) 発明者

河野 弘明

静岡県駿東郡長泉町納米里410- 1

(74) 代理人

100106574

弁理士 岩橋 和幸

審査官 亀田 宏之

(56) 参考文献

特開 平 4 - 204257 (J P, A)

特開 昭59-224565 (J P, A)

特開 昭61-100660 (J P, A)

特表 平 4 - 506415 (J P, A)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電するように調製し、試料中の被測定抗原または被測定抗体とを反応させ、該反応における抗原-抗体の凝集変化を測定することを特徴とする、抗原または抗体の免疫凝集定量方法。

【請求項 2】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電させる方法が、該抗体または抗原を等電点が一定範囲になるように精製した後、該等電点より pH の高い反応液中で反応させる方法である請求項 1 記載の定量方法。

【請求項 3】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電させる方法が、化学修飾で該抗体または抗原の等電点を変更した後、該等電点より pH の高い反応液中で反応させる方法である請

2

求項 1 記載の定量方法。

【請求項 4】 化学修飾が、二価性架橋剤を用いてウシ血清アルブミン (B S A) と結合させる方法である請求項 3 記載の定量方法。

【請求項 5】 化学修飾が、アシル化法である請求項 3 記載の定量方法。

【請求項 6】 被測定抗原が C 反応性蛋白質である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の定量方法。

【請求項 7】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原と、該抗体または該抗原が反応液中で陰性に荷電するような pH の緩衝液とを含有する抗原または抗体の免疫凝集定量用試薬。

【請求項 8】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原が、化学修飾された抗体または抗原である請求項 7 記載の試薬。

【請求項9】 化学修飾された抗体または抗原が、ウシ血清アルブミンと結合した抗体または抗原である請求項8記載の定量用試薬。

【請求項10】 化学修飾された抗体または抗原が、アシル化された抗体または抗原である請求項8記載の定量用試薬。

【請求項11】 被測定抗原が、C反応性蛋白質である請求項7～10のいずれかに記載の定量用試薬。

【請求項12】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電するように調整することを特徴とする、インターバル現象抑制方法。

【請求項13】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電させる方法が、該抗体または抗原を等電点が一定範囲になるように精製した後、精製した抗体または抗原を該等電点よりpHの高い緩衝液中に含有させる方法である請求項12記載の抑制方法。

【請求項14】 被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電させる方法が、化学修飾で該抗体または抗原の等電点を変更した後、等電点を変更された抗体または抗原を該等電点よりpHの高い緩衝液中に含有させる方法である請求項12記載の抑制方法。

【請求項15】 化学修飾が、二価性架橋剤を用いてウシ血清アルブミン(BSA)と結合させる方法である請求項14記載の抑制方法。

【請求項16】 化学修飾が、アシル化法である請求項14記載の抑制方法。

【請求項17】 被測定抗原がC反応性蛋白質である、請求項12～16のいずれかに記載の抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床検査試薬等で多用されている免疫凝集測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫学的測定法のひとつである免疫比濁法は、抗原-抗体反応により抗原と抗体が結合して免疫複合体を形成したときの濁りの変化を光学的に検出・測定する方法である。免疫比濁法により、被測定抗原または被測定抗体を自動分析機を用いて連続的に定量する際に、測定を一度中断した後に再び測定を再開すると非特異的凝集が強くなるインターバル現象が生じるため、誤った測定値を与えることがある。

【0003】免疫比濁法における非特異的凝集を防止するため、被測定抗原に対する抗体をアシル化剤で化学的に修飾する方法(特公平2-14661号公報)、被測定抗原に対する抗体に化学的に蛋白質を結合させる方法(特開平3-148065号公報)、反応液のpHを8.5以上にする方法(特開平1-158057号公報)が知られている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】本発明の目的は、被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電する状態で被測定抗原または被測定抗体と反応させることにより、非特異的凝集とりわけ連続的な測定中のインターバル現象が無い簡便な免疫凝集測定法を提供することである。

【0006】

10 【課題を解決するための手段】本発明は、被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を陰性に荷電する状態で、試料中の被測定抗原または被測定抗体と反応させ、該反応における抗原-抗体の凝集変化を測定することを特徴とする抗原または抗体の免疫凝集定量法に関する。

【0007】本発明における免疫凝集定量法とは、抗原-抗体反応によって抗原分子と抗体分子が結合して大きな免疫複合体を形成し、その複合体を定量するような方法であればよく、必要により被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原と担体とを結合させた方法でもよい。担体と結合させた方法としてはラテックス凝集比濁法、赤血球凝集法等があげられる。

【0008】本発明における被測定抗原または被測定抗体としては、がん胎児性抗原(CEA)、免疫グロブリン(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)、補体(C3、C4、C5、C1q)、C反応性蛋白(CRP)、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -マイクログロブリン、 β_2 -マイクログロブリン、ハプトグロブリン、トランスフェリン、セルロプラスミン、フェリチン、アルブミン、ヘモグロビンA₁、ヘモグロビンA_{1c}、ミオグロビン、ミオシン、デュパン-2、 α -フェトプロテイン(AFP)、組織ポリペプチド抗原(TPA)、アポリポ蛋白A₁、アポリポ蛋白B、アポリポ蛋白C₂、アポリポ蛋白C₃、アポリポ蛋白E、リウマチ因子、抗ストレプトリジンO(ASO)、フィブリン分解産物(FDP)、フィブリン分解産物D分画(FDP-D)、フィブリン分解産物D-D分画(FDP-D Dimer)、フィブリン分解産物E分画(FDP-E)、アンチトロンビン-III(AT-III)等の蛋白質、アミラーゼ、前立腺由来酸性ホスファターゼ(PAP)、神経特異エノラーゼ(NSE)、フィブリノーゲン、エラスターゼ、プラスミノゲン、クレアチンキナーゼ心筋型(CK-MB)等の酵素、インシュリン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、3,5,3'-トリヨードサイロニン(T₃)、サイロキシニン(T₄)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、生長ホルモン(GH)、黄体化ホルモン(LH)等のホルモン、B型肝炎ウイルス関連抗体、B型肝炎ウイルス関連抗原、C型肝炎ウイルス抗体、HTLV(成人T細胞白血病ウイルス)抗体、HIV(エイズウイルス)抗体、クラミジア抗体、梅毒の

抗体、トキソプラズマ抗体等各種感染症の原因ウイルスに対する抗体等があげられる。

【0009】また被測定抗原に対する抗体は、被測定抗原に対するポリクローナル抗体、被測定抗原に対するモノクローナル抗体等通常抗原に対して反応し得る抗体があげられる〔「単クローン抗体実験マニュアル」、富山朔二ら編、講談社サイエンティフィック刊、1987年：新生化学実験講座 第12巻、「分子免疫学 III 抗原、抗体、補体」、日本生化学会編、東京化学同人社刊、1992年〕。該抗体は複数の抗体からなるものでもよく、抗体を限定分解したものでもよい。

【0010】また被測定抗体に対する抗原は、天然の抗原の抗体結合部位でもよく、遺伝子操作等により人工的に作成されたものでもよい。例えば、被測定抗体が各種感染症の原因ウイルスに対する抗体である場合、被測定抗体に対する抗原は上述の感染症のウイルスのマーカー蛋白質等を用いることができる。該抗原は複数の抗原分子からなるものでもよく、抗原分子を限定分解したものでもよい。

【0011】また本発明の定量法が、担体を用いる場合、例えばラテックス凝集法の場合は、ラテックスと結合した被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を用いればよく、赤血球凝集法を用いる場合は、被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を赤血球の表面に吸着させて用いればよい。

【0012】被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を反応液中陰性に荷電させる方法としては、該抗体または抗原を等電点が一定範囲になるように精製した後、該等電点よりpHの高い反応液中で反応させるか、または化学修飾等で該抗体または抗原の等電点を変更した後、該等電点よりpHの高い反応液中で反応させる方法があげられる。

【0013】該抗体または抗原を等電点が一定範囲になるようにする精製法とは、等電点が一定範囲になる方法であればどのようなものでもよいが、例えばイオン交換クロマトグラフィー法、等電点クロマトグラフィー法、等電点沈殿法、等電点電気泳動法、クロマトフォーカシング法等があげられ、これらを組み合わせて用いてもよい。

【0014】該抗体または抗原の等電点を変更する化学修飾法とは、当該抗体または抗原の結合活性を低下させずに等電点を変更する化学修飾法〔生物化学実験法12および13巻、蛋白質の化学修飾上刊および下刊、1986年、学会出版センター刊〕であればどのようなものでもよいが、例えば二価性架橋剤をもちいることによりウシ血清アルブミン(BSA)と結合させる方法、抗原または抗体のリジン残基を無水コハク酸によりサクシニル化させる等のアシル化法等があげられる。

【0015】以下に本発明方法を詳細に説明する。イオン交換クロマトグラフィーにおいては、被測定抗原に

する抗体または被測定抗体に対する抗原約10mg~2gをpH6.5~9.0の緩衝液に溶解し、陰イオン交換クロマトグラフィー等により分離した後、所望の等電点のフラクションを集めることにより、等電点が一定の被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原を調製する。

【0016】緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液、グリシン緩衝液、バルビタール緩衝液、ホウ酸緩衝液等があげられ、陰イオン交換クロマトグラフィーとしては、DEAE-セファデックス、DEAE-セファセル、DEAE-セファクリル交換クロマトグラフィー等があげられる。

【0017】また、化学修飾法におけるアシル化法としては、被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原約1~100mgをpH6.0~9.0の緩衝液中、該抗原または抗体に対し2~10000倍量のアシル化剤と0~30℃で0.5分~12時間反応させる。得られたアシル化抗原または抗体はカラムクロマトグラフィー等の常法により分離される。アシル化剤としては無水コハク酸、無水酢酸、N-アセチルスクシンイミド、N-ヒドロキシスクシイミドアセテート、N-アセチルイミダゾール等があげられる。

【0018】化学修飾法としてBSA複合体を作成するときは、緩衝液中被測定抗原に対する抗体または被測定抗体に対する抗原約1~500mgを該抗原または抗体に対し2~10000倍量のN-[(E)-マレイミドカプロイルオキシ]スクシニミド(EMCS)等化学修飾試薬と0~40℃で0.5~120分間反応させる。一方、BSA1~500mgとBSAに対し2~5000倍量のS-アセチルメルカプト無水コハク酸、N-スクシニミジル-3-(2'-ピリジルジチオ)プロピオン酸、イミノチオラン等化学修飾試薬を、緩衝液中、0~40℃で0.5~120分間反応させる。得られた化学修飾化抗体または抗原と等量の化学修飾化BSAとを、緩衝液中0~40℃で0.5~120分間反応させて該抗原または抗体とBSAとの複合体を得る。

【0019】上述の化学修飾反応において、緩衝液は前記と同義であり所望により、アルブミン等の安定化剤、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレンジアミン四酢酸(EGTA)等のキレート剤を含有してもよい。また上述の化学修飾反応における中間体および生成物は、必要によりゲル濾過等カラムクロマトグラフィー等により精製して用いてもよい。

【0020】本発明における抗原または抗体の免疫凝集定量法は、一般的な抗原抗体反応の条件下で行われ、被測定抗原と被測定抗原に対する抗体とを、または被測定抗体と被測定抗体に対する抗原とを、中性、弱塩基性または弱酸性に調整したリン酸緩衝液、フタル酸緩衝液、グッド緩衝液、トリス-塩酸緩衝液等の緩衝液の存在

下、4～40℃で30秒～72時間反応させる。

【0021】反応系には、ポリエチレングリコール（PEG）6000、ポリビニルピロリドン、デキストラン、デキストラン硫酸等の凝集促進剤、ゼラチンやカゼインなどの蛋白成分、ポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル（PMG50）等の界面活性剤、塩化ナトリウム、塩化カルシウム等の塩類、マグネシウム等の金属イオン、アルブミン等の安定化剤等を適宜添加することができる。これらの添加物は被測定物を失活させることがなく、かつ抗原抗体結合反応および免疫凝集反応を阻害しないものであればいずれも利用できる。

【0022】反応後の物質の凝集変化の測定手段自体はいずれも公知の手段が適用でき、反応開始後の凝集速度の変化を濁度計、吸光光度計で測定する。

【0023】

【実施例】以下実施例によって、本発明を説明する。

【0024】実施例1

a、抗ヒトCRP-ウサギIgGの精製
抗ヒトC反応性蛋白（CRP）ウサギ血清（オリエンタル酵母社製）20mlを3Mの塩化ナトリウムを含む1.5Mのグリシン緩衝液（pH8.9、緩衝液A）で3倍に希釈し、緩衝液Aで平衡化されたプロテインA-セファロース4Bゲル（ファルマシア社）20mlが充填されたカラムに添加した。添加後カラムを生理食塩含有リン酸緩衝液（PBS）で洗浄した後、50mMのグリシン/塩酸緩衝液（pH2.5）でIgGを溶出した。溶出したIgG溶液は直ちに1Mのリン酸緩衝液（pH7.5）で中性化し、10mMのリン酸緩衝液（pH8.5）1Lに対して4℃で一夜透析をおこない、これを3回繰り返した。回収したIgGはSDS-PAGE電気泳動において単一バンドを示した。得られた精製抗ヒトCRP-ウサギIgGを以下の実験に用いた。

【0025】b、試薬中で陰性荷電を帯びる抗体の選別
10mMのリン酸緩衝液（pH8.5）で平衡化したDEAE-セファセルカラム（ファルマシア社、2.5cm×20cm）にa項で得られたIgG画分を添加し、0～0.5Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配により溶出をおこない、溶出液を10mlフラクションとして回収した。各フラクション中のIgGをファルマシア社製のファーストシステムとIEFゲルを用いて等電点電気*

*泳動を行い、バイオラッド社製の等電点マーカーを基に、各フラクション中に含まれるIgGの等電点を決定し、等電点が7以下となるIgGを含むフラクションを選別した。

【0026】c、選別抗体を用いた測定試薬によるCRPの免疫比濁法測定

透明な合成樹脂を反応容器とする多項目選択機能を持つ直接測光方式の生化学用自動分析機〔日立736自動分析機、日立工機（株）製〕を用いて、検体中のCRP濃度を測定した。この自動分析機の反応容器は多数のセルがおのおの独立して円盤状に集まっており、この円盤状反応容器が間欠的に回転し、各セルは一つずつポイントを通過しながら最初の位置に戻ってくる間に、1回の測定操作および洗浄操作が終了する仕組みである。

【0027】b項で得られた等電点7以下の抗ヒトCRPウサギIgGおよびpH7.2の反応液を用いて自動分析機にて、次の操作をおこなった。

【0028】第一のポイントでサンプラーからCRPスタンダード（オリエンタル酵母社製）10μlをセルに添加した。このセルを第二のポイントに移送した。ここでポリエチレングリコール（PEG）6000（50mg/ml）、塩化ナトリウム100mM、PGM50（1mg/ml）およびアジ化ナトリウム1mg/mlを含む20mMグッドの緩衝液（pH7.2）350μlを第一試薬として添加し、第三のポイントに移送されるまでの5分間、37℃で予備反応させた。第三のポイントで選別抗ヒトCRP-ウサギIgG（6.5mg/ml）、塩化ナトリウム100mM、およびアジ化ナトリウム1.0mg/mlを含む20mMグッドの緩衝液（pH7.2）50μlを第二試薬として添加し第四のポイントに移送される5分間、37℃で本反応させた。第四のポイントで反応を終了させた。予備反応時間、本反応時間計7.5分間に約20秒間隔で20回（20ポイント）にわたり溶液の濁度を吸光光度法（340nm、700nm）で測定し、吸光度の変化を記録した。予備反応における吸光度変化および第二試薬添加後の抗原-抗体反応（本反応）による吸光度変化の結果を第1表に示した。

【0029】

【表1】

第1表

| 用いた抗ヒトCRP-ウサギIgG | | | 吸光度（mABS） | |
|------------------|--------|--------|-----------|-----|
| 抗体の処理法 | 抗体の等電点 | 反応液のpH | 予備反応 | 本反応 |
| イオン交換クロマト | 7.0以下 | 7.2 | 0 | 3.8 |

【0030】またCRPスタンダードを上記のリン酸緩衝液で希釈し（0.5、1、3、6、9、12、15m

g/dl）、得られた希釈液を上記の方法で測定して検量線を作成した。結果を図1に示した。

【0031】実施例2

実施例1のb項において得られたIgGのうち、等電点が7.5～8.0になる抗体を用い、反応液のpHを8.5に代える以外は実施例1と同様にして予備反応における吸光度変化および第二試薬添加後の抗原-抗体反*

*応(本反応)による吸光度変化を求めた。結果を第2表に示した。

【0032】

【表2】

第2表

| 用いた抗ヒトCRP-ウサギIgG | 抗体の等電点 | 反応液のpH | 吸光度 (mABS) | |
|------------------|-------------|--------|------------|-----|
| | | | 予備反応 | 本反応 |
| イオン交換カラム | 7.5 ～8.0 | 8.5 | 0 | 38 |

【0033】またCRPスタンダードを上記のリン酸緩衝液で希釈し(0.5、1、3、6、9、12、15mg/dl)、得られた希釈液を上記の方法で測定して検量線を作成した。結果を図2に示した。

【0034】実施例3

a、スクシニル化IgGの作製

実施例1のa項で精製した抗ヒトCRP-ウサギIgG 20の外液を透析で0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)に置換した後、IgG分子量の25倍の無水コハク酸/0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)溶液を加え、15℃で45分間反応させた。反応終了後、PBSで平衡化したG-25カラムに掛け、IgG画分を回収し、スク*

※スクシニル化抗ヒトCRP-ウサギIgGとした。スクシニル化抗ヒトCRP-ウサギIgGの等電点を実施例1のb項で行った等電点電気泳動と同様の方法で測定し、等電点が7以下となっていることを確認した。

【0035】b、スクシニル化抗ヒトCRP-ウサギIgGを用いたCRPの免疫比濁法測定

スクシニル化抗ヒトCRP-ウサギIgGを用いる以外は実施例1と同様にして、予備反応における吸光度変化および第二試薬添加後の抗原-抗体反応(本反応)による吸光度変化を求めた。結果を第3表に示した。

【0036】

【表3】

第3表

| 用いた抗ヒトCRP-ウサギIgG | 抗体の等電点 | 反応液のpH | 吸光度 (mABS) | |
|------------------|--------|--------|------------|-----|
| | | | 予備反応 | 本反応 |
| スクシニル化 | 7.0以下 | 7.2 | 0 | 38 |

【0037】またCRPスタンダードを上記のリン酸緩衝液で希釈し(0.5、1、3、6、9、12、15mg/dl)、得られた希釈液を上記の方法で測定して検量線を作成した。結果を図3に示した。

【0038】実施例4

a、IgG-BSAコンジュゲートの作成

実施例1のa項で得たIgGの外液を透析によって0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に置換した後、IgG 40分子量の25倍のEMCS(同人化学社)/DMF溶液を攪拌しながら加えて30℃で30分間反応させIgGにマレイミド基を導入した。IgGは0.1Mのリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化したセファデックスG-25カラムに掛け、未反応の試薬を除去し、マレイミド基導入IgGを回収した。BSA1gを0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、これにBSA分子量の50倍のイミノチオラン(ピナス社)/0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)を加えて30℃で30分間反応させ、5mMのEDTAを含む0.1Mのリン酸緩衝液

(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(ファルマシア社)に掛け、未反応の試薬を除去するとともにSH基導入BSAを回収した。マレイミド基を導入したIgGとSH基を導入したBSAとをモル比が等しくなるように混合し、30℃で30分間反応させたのち、PBSで平衡化したAcA22カラム(LKB社、3cm×100cm)に掛け、IgG-BSA複合体を精製回収した。回収した複合体は実施例1のa項で行ったのと同じ方法で等電点電気泳動分析を行い、等電点が7以下に変化していることを確認した。

【0039】b、抗ヒトCRP-ウサギIgG-BSAコンジュゲートを用いたCRPの免疫比濁法測定
抗ヒトCRP-ウサギIgG-BSAコンジュゲートを用いる以外は、実施例1と同様にして、予備反応における吸光度変化および第二試薬添加後の抗原-抗体反応(本反応)による吸光度変化を求めた。結果を第4表に示した。

【0040】

【表4】

第4表

| 用いた抗ヒトCRP-ウサギIgG | | | 吸光度 (mABS) | |
|------------------|--------|------------|------------|-----|
| 抗体の 処理法 | 抗体の等電点 | 反応液の pH | 予備反応 | 本反応 |
| BSA コンジュゲート | 7.0以下 | 7.2 | 0 | 45 |

【0041】またCRPスタンダードを上記のリン酸緩衝液で希釈し(0.5、1、3、6、9、12、15mg/dl)、得られた希釈液を上記の方法で測定して検量線を作成した。結果を図4に示した。

【0042】以下に本発明のインターバル現象に対する効果を試験例で説明する。

試験例1. 実施例1で用いた自動分析機を用い、実施例1で用いた等電点7以下の抗ヒトCRP-ウサギIgGに対する比較対照として等電点により分離する前の精製抗ヒトCRP-ウサギIgG(比較対照1)または実施例1のb項と同様にして得られる等電点8以上の抗ヒトCRP-ウサギIgG(比較対照2)を用い、反応液のpHが7.2の状態では実施例1の方法に準じて連続的な測定を次のように行った。

【0043】生理食塩水を10検体、実施例1で用いたCRPスタンダードを6検体、生理食塩水を20検体順に連続測定した後、測定を2時間中断した。測定再開後、生理食塩水50検体の濁度を連続的に測定した。結果を図5に示した。

【0044】図5によれば、比較対照1および比較対照2はインターバル現象を示したものの、実施例1で用いた抗ヒトウサギIgGはインターバル現象を示さなかった。

【0045】試験例2. 実施例1で用いた自動分析機を用い、実施例2で用いた抗ヒトCRP-ウサギIgG(等電点7.5~8.0)を用い、実施例2と同じpH8.5の反応液またはpH7.2の反応液(比較対照)を用いて実施例1の方法に準じて連続的な測定を次のように行った。

【0046】生理食塩水を10検体、実施例1で用いたCRPスタンダードを6検体、再び生理食塩水を20検体順に連続測定した後、測定を2時間中断した。測定再開後、生理食塩水50検体の濁度を連続的に測定した。結果を図6に示した。

【0047】図6によれば、比較対照はインターバル現象を示したものの、実施例2で用いた抗ヒトCRP-ウサギIgGはインターバル現象を示さなかった。

【0048】試験例3. 実施例1で用いた自動分析機を

用い、実施例3で用いたスクシニル化抗ヒトCRP-ウサギIgGまたは比較対照としてスクシニル化をしていない精製抗ヒトウサギIgGを用い、実施例1の方法に準じて連続的な測定を次のように行った。

【0049】生理食塩水を10検体、実施例1で用いたCRPスタンダードを6検体、生理食塩水を20検体順に連続測定した後、測定を2時間中断した。測定再開後、生理食塩水50検体の濁度を連続的に測定した。結果を図7に示した。

【0050】図7によれば、非スクシニル化の比較対照はインターバル現象を示したものの、実施例3で用いたスクシニル化抗ヒトCRP-ウサギIgGはインターバル現象を示さなかった。

【0051】試験例4. 実施例1で用いた自動分析機を用い、実施例4で用いたBSA結合抗ヒトCRP-ウサギIgGまたは比較対照としてBSAと結合していない精製抗ヒトCRP-ウサギIgGを用い、実施例1の方法に準じて連続的な測定を次のように行った。

【0052】生理食塩水を10検体、実施例1で用いたCRPスタンダードを6検体、生理食塩水を20検体順に連続測定した後、測定を2時間中断した。測定再開後、生理食塩水50検体の濁度を連続的に測定した。結果を図8に示した。

【0053】図8によれば、比較対照はインターバル現象を示したものの、実施例4で用いたBSA化抗ヒトCRP-ウサギIgGはインターバル現象を示さなかった。

【0054】

【発明の効果】本発明により、連続的な測定においてもインターバル現象を示さない、非特異的凝集の無い免疫凝集定量法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1で得た検量線

【図2】 実施例2で得た検量線

【図3】 実施例3で得た検量線

【図4】 実施例4で得た検量線

【図5】 実施例1の連続測定系における非特異的凝集

【符号の説明】

13

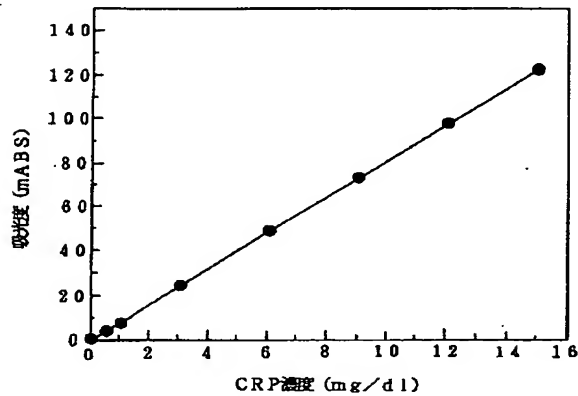
- 比較対照1 (等電点不均一の抗体)
- 比較対照2 (等電点8以上の抗体)
- 実施例1 (等電点7以下の抗体)

【図6】 実施例2の連続測定系における非特異的凝集
【符号の説明】

- 比較対照 (反応液のpH7.2)
- 実施例2 (反応液のpH8.5)

【図7】 実施例3の連続測定系における非特異的凝集

【図1】



14

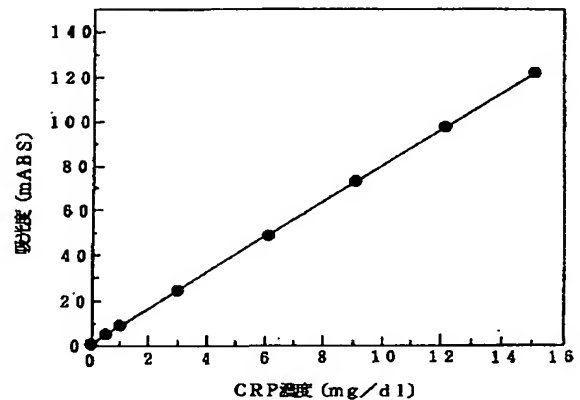
【符号の説明】

- 比較対照 (非スクシニル化抗体)
- 実施例3 (スクシニル化抗体)

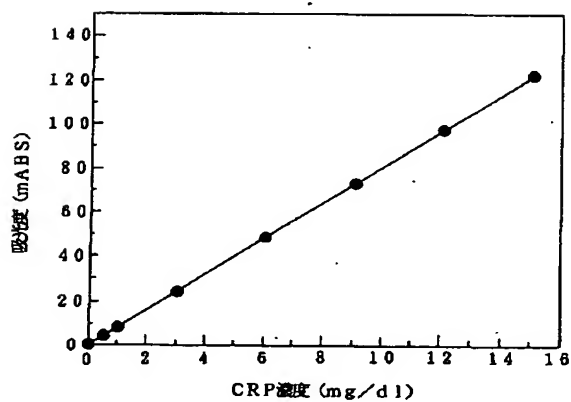
【図8】 実施例4の連続測定系における非特異的凝集
【符号の説明】

- 比較対照 (B S A非結合抗体)
- 実施例4 (B S A結合抗体)

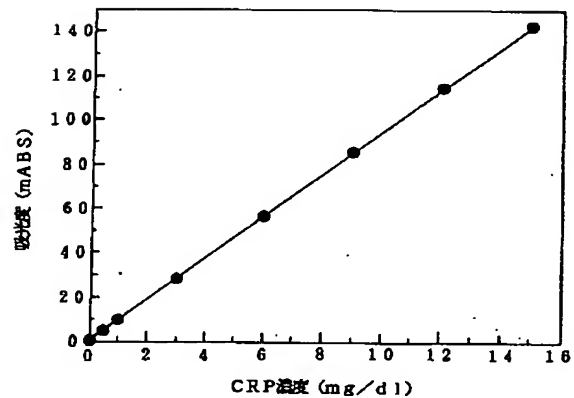
【図2】



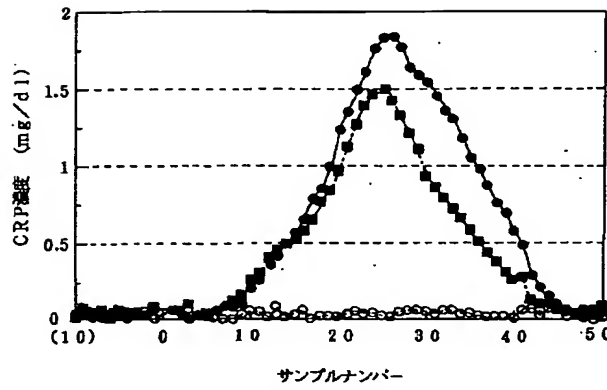
【図3】



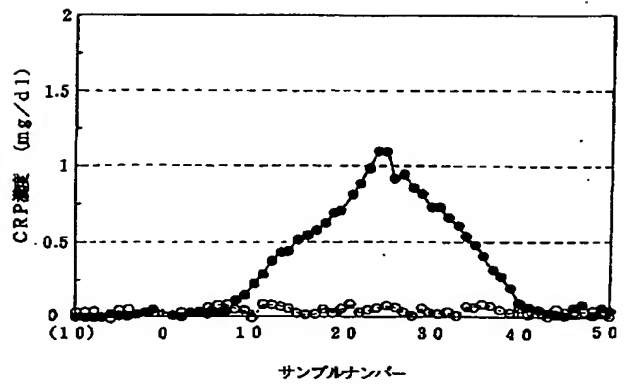
【図4】



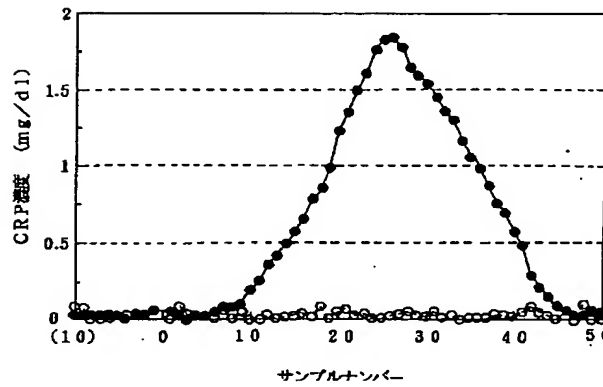
【図5】



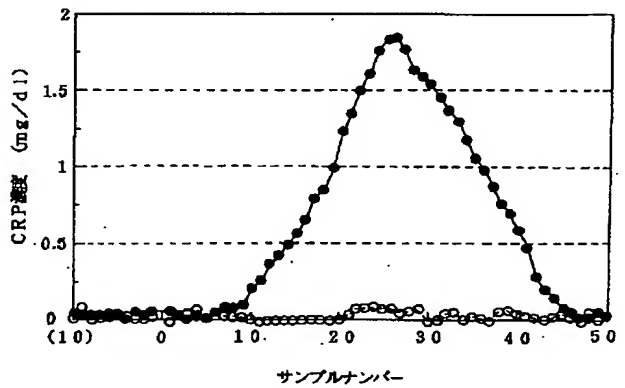
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(58) 調査した分野(Int. Cl.⁷, DB名)

G01N 33/536

G01N 33/531

G01N 33/543